

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/L.

kom. Leiter: Prof. Dr. Kaffarnik

Untersuchungen zur Methode und
Anwendung einer radioimmunologischen
Proinsulin-Bestimmung im Serum mit
einer insulinabbauenden Protease aus
Lebergewebe der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

JOACHIM KLIMEK

aus Dortmund

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/L.

kom. Leiter: Prof. Dr. Kaffarnik

Untersuchungen zur Methode und
Anwendung einer radioimmunologischen
Proinsulin-Bestimmung im Serum mit
einer insulinabbauenden Protease aus
Lebergewebe der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

JOACHIM KLIMEK

aus Dortmund

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 5.11.1976

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr.med. F. Neurath

Referent: Priv.Do. Dr.med. L. Hausmann

Korreferent: Prof. Dr.med.dent. G. Ahrens

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Geschichte des Proinsulins	1
1.2. Struktur und Eigenschaften des Proinsulins	2
1.3. Die quantitative Erfassung des Proinsulins	3
1.4. Fragestellung	4
2. <u>Methoden</u>	5
2.1. Insulinbestimmung	5
2.1.1. Arbeitsprinzip der radioimmunologischen Insulinbestimmung	5
2.1.2. Herstellung der Puffer und der Insulinstandardlösungen	6
2.1.3. Methodischer Ablauf der Insulinbestimmung	7
2.2. Proinsulinbestimmung	8
2.2.1. Präparation des Calcium-Phosphat-Gels	8
2.2.2. Proteinbestimmung durch Extinktion bei 260 m μ und 280 m μ	8
2.2.3. Methode zur Gewinnung und Anreicherung der Insulin-abbauenden Protease (ISP)	8
2.2.4. Messung von Proinsulin im menschlichen Serum	11
2.3. Messung der Insulin-abbauenden Aktivitäten in Leber- und Muskelgewebe	11
2.4. Glukosestoffwechselbelastungen	12
2.4.1. Oraler Glukosebelastungstest mit 100 g Traubenzucker (OGTT)	12
2.4.2. Intravenöser Tolbutamid-Test (TOLT)	12
3. <u>Ergebnisse</u>	13
3.1. Insulinabbauende Aktivitäten verschiedener Organhomogenate	13
3.2. Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Gel zu Protein bei der Anreicherung der Protease	13

	Seite
3.3. Abbau von verschiedenen Insulinen durch die angereicherte Protease (ISP) in Abhängigkeit von der Zeit	17
3.4. Abbau von verschiedenen großen Insulin- und Proinsulingehalten durch ISP	17
3.5. Abbau von Insulin bei zeitlich versetzter zweimaliger Zugabe von ISP	23
3.6. Bestimmung unterschiedlicher Proinsulingehalte in Humanserum	23
3.7. Bestimmung des Proinsulingehalts von Mischungen mit bekanntem Insulin- und Proinsulingehalt	24
3.8. Insulin- und Proinsulingehalt beim oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) und beim Tolbutamid-Test	24
4. <u>Diskussion</u>	26
4.1. Abbauege des Insulins	26
4.1.1. Insulinabbau durch Proteolyse	26
4.1.2. Insulinabbau durch Reduktion	26
4.1.3. Bedeutung der beiden Abbauege	27
4.2. Verwendung des proteolytischen Abbaueges zur quantitativen Proinsulinbestimmung	28
4.3. Methodische Betrachtungen	30
4.3.1. Auswahl des Organs	30
4.3.2. Calcium-Phosphat Gel Adsorption und Elution	31
4.3.3. Radioimmunologische Insulin- und Proinsulin-Bestimmung	32
4.4. Eignung der angereicherten Protease für klinische Bedürfnisse	33
4.5. Vergleich der mit der ISP-Methode gemessenen Proinsulinwerte mit denen nach anderen Methoden bestimmten Werten	34
4.5.1. Proinsulin beim nüchternen Probanden	34
4.5.2. Proinsulin beim oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT)	36

	Seite
4.5.3. Proinsulin beim Tolbutamid-Test (TOLT)	36
4.6. Zur Bedeutung des Auftretens von Proinsulin in der Peripherie	37
4.7. Perspektive der Proinsulinbestimmung nach der ISP-Methode	38
5. <u>Zusammenfassung</u>	40
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	41

Verzeichnis der Tabellen

Nr.	Text	Seite
1	Arbeitsgänge zur Anreicherung der "Insulin spezifischen Protease" aus Rattenleber	10
2	Aktivität der eluierten Protease und des ersten Überstands bei der Anreicherung über Ca-Phosphat Gel gegen Humaninsulin in Abhängigkeit vom Verhältnis Gel : Protein	16
3	Abbau verschiedener Insuline durch 25 μ l der insulinabbauenden Protease in Abhängigkeit von der Zeit	19
4	Abbau von mit Humanalbuminpuffer verdünntem reinem Schweine-Insulin und -Proinsulin durch 25 μ l ISP bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten	21
5	Insulin- (TIR) und Proinsulin-Gehalt (IRP) eines Humanserums, welches mit Humanalbuminpuffer unterschiedlich verdünnt wurde	23
6	Immunologisch meßbare Verbindungen in Proben mit einem bekannten Insulin- und Proinsulin-Gehalt vor und nach Inkubation mit der ISP (Angaben in μ E/ml)	24

Verzeichnis der Abbildungen

Nr.	Text	Seite
1	Insulinabbauende Aktivitäten von Homogenaten (Leber, Niere, Muskel, Milz der Ratte) gegenüber Humaninsulin, Humanserum und reinem Schweineproinsulin bei verschiedenen langen Inkubationszeiten	14
2	Aktivität der eluierten Protease und des ersten Überstands bei der Anreicherung über Ca-Phosphat Gel gegen Humaninsulin in Abhängigkeit vom Verhältnis Gel : Protein	15
3	Aktivität der insulinabbauenden Protease aus Rattenleber gegenüber Humanserum, Humaninsulin, reinem Schweineinsulin und -Proinsulin in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	18
4	Aktivität der insulinabbauenden Protease gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von reinem Schweineinsulin und -Proinsulin bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten	20
5	Abbau von 100 μ E eines reinen Schweineinsulins (100 μ E/ml) durch 25 μ l ISP in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Nach 15 Minuten wurde einer 2. Probe nochmals 25 μ l ISP zugegeben.	22
6	Insulin (TIR) und Proinsulin (IRP) nach oraler Belastung mit 100 g Traubenzucker (n=13) und i.v. Gabe von 1 g Tolbutamid (n=7)	25
7	Vereinfachtes Modell der Abbauege des Insulins nach THOMAS (1973)	27
8	Zwischenstufen bei der Umwandlung von Insulin in Proinsulin	29

Benutzte Abkürzungen

ISP	Insulin specific Protease
NEM	N - Äthylmaleinimid
TIR	"total immunoreactive material"
IRI	"immunoreactive insulin"
IRP	"immunoreactive proinsulin"
GIT	Glutathion-Insulin-Transhydrogenase
IBR	Insulinbindungsreagenz
OGTT	Oraler Glukose-Belastungs-Test
TOLT	Intravenöser Tolbutamid-Test

1. Einleitung

1.1. Geschichte des Proinsulins

Nachdem bekannt war, daß Insulin aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten besteht, begann die Suche nach einem biologischen Vorläufer des Insulins. WANG und CARPENTER (1965) gingen davon aus, daß es zwei mögliche Wege der Insulinbiosynthese gibt : Eine Kettenaddition oder eine Kettendivision. Das Ergebnis ihrer Suche nach einem "Proinsulin" in Pankreasextrakten war die Feststellung, daß ein mögliches Proinsulin weniger als 10 % vom Gesamtpankreasinsulin ausmachen würde.

1966 gelang es STEINER und OYER, ein einkettiges Protein mit höherem Molekulargewicht als Insulin als den biologischen Vorläufer des Insulins nachzuweisen.

Sie verwandten dazu das Gewebe eines Inselzelltumors, welches nach Inkubation in H^3 -Leucin und Alkoholextraktion durch Gel-Filtration über Sephadex® getrennt wurde. Dabei wurde neben dem Insulin ein zweites markiertes Protein gefunden, welches immunologisch und chemisch mit Insulin verwandt war. Das Molekulargewicht dieses einkettigen Proteins betrug ca. 10.800 (Insulin 6000), und es enthielt die Aminosäuresequenz des Insulins.

ROTH, GORDON und PASTAN fanden 1968, daß endogenes Plasmainsulin zwei Komponenten hat. Die eine Komponente ist dem Pankreasinsulin sehr ähnlich, bei der anderen handelt es sich um ein längerkettiges Protein, welches immunologisch weniger aktiv war. Der Anteil der zweiten Komponente am Plasmainsulin betrug bis zu 50 %. Die Autoren bezeichneten die beiden Komponenten als "little" und "big Insulin". Als Molekulargewicht für "big Insulin" gaben sie 8 - 9000 an. Ebenfalls 1968 gelang es RUBENSTEIN, CHO und STEINER, Proinsulin in Urin und Serum des Menschen nachzuweisen. LAZARUS, TANESE, GUTMAN und REGANT konnten 1970 zeigen, daß "big Insulin" mit Proinsulin identisch ist. Diese Entdeckungen gaben den Anlaß zu einer Reihe von weiteren Untersuchungen über das Proinsulin.

1.2. Struktur und Eigenschaften des Proinsulins

Die Struktur und die Aminosäuresequenz des Proinsulins und des bei der Umwandlung des einkettigen Proinsulins in das zweikettige Insulin abgespaltenen C-Peptids wurde bei verschiedenen Mammalia-Spezies aufgeklärt (OYER et al., 1970; MELANI et al., 1971; GUTMAN et al., 1972; CHANCE et al., 1968; CHANCE, 1972).

Die einzelne Polypeptidkette des Proinsulins beginnt mit der B-Kette des Insulins, es folgt ein Polypeptidsegment mit 30 Aminosäuren, und es endet mit der A-Kette des Insulins (MELANI et al., 1970; STEINER et al., 1969). Die charakteristischen Disulfid-Brücken des Insulinmoleküls sind im Proinsulin schon vorhanden. Verschiedene physikalische und immunologische Daten zeigen, daß das räumliche Arrangement des Insulinteils des Proinsulinmoleküls dem des Insulins sehr ähnlich, wenn nicht identisch ist (MELANI et al., 1971; RUBENSTEIN et al., 1969). Die primäre Struktur des Proinsulins läßt den Schluß zu, daß Insulin durch Abspaltung des C-Peptids entsteht. Die Annahme wird durch den Nachweis von zwei doppelkettigen Zwischenstufen, Desdipeptid-Proinsulin und Diarginyl-Insulin bei der Umwandlung von Proinsulin in Insulin untermauert (STEINER et al., 1968).

Die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin findet in den Beta-Zellen des Pankreas statt (KATZ und RUBENSTEIN, 1973; SHERMAN et al., 1971; ANSORGE et al., 1973). Bei in vitro Versuchen konnte mit Trypsin eine Umwandlung von Schweine-Proinsulin zu Desalanin-Insulin erreicht werden (OYER et al., 1970). Die weitere Umwandlung wird wahrscheinlich durch andere Enzyme katalysiert. YIP (1971) fand ein Rinderpankreasenzym, das die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin katalysiert, KEMMLER et al. (1971) gelang es mit einer Kombination von Trypsin und Carboxypeptidase B, Proinsulin in Insulin und C-Peptid zu spalten. Insulin und C-Peptid werden in äquimolarem Verhältnis in den Beta-Zellen gespeichert (RUBENSTEIN et al., 1969; STEINER et al., 1970). In der Zirkulation treten sie nach neueren Forschungen nicht unbedingt in äquimolarem Verhältnis auf.

Trotz weiterer Arbeiten über die Insulin-Biosynthese konnte ihr Ablauf noch nicht endgültig geklärt werden.

Die Tatsache, daß man Proinsulin und C-Peptid im Serum und im Urin von Menschen nachweisen konnte, war der Anlaß zu Untersuchungen über eine mögliche biologische Aktivität der beiden Verbindungen. Untersuchungen an isolierten Fettzellen zeigten, daß bei Proinsulin eine dem Insulin ähnliche Aktivität vorhanden ist. Allerdings beträgt sie nur 2 % der Insulin-Aktivität (YU, STEPHEN, KITABCHI, 1973; CHAJEK, TANENBAUM, SHAPIRA et al., 1972). Auch Untersuchungen anderer Autoren ergaben, daß Proinsulin nur eine sehr geringe biologische Aktivität hat (STOLL et al., 1970; GOLDSMITH et al., 1969; MELANI et al., 1970). Für das C-Peptid wurde keine dem Insulin vergleichbare biologische Aktivität gefunden (STOLL et al., 1970). Untersuchungen über den Stoffwechsel zeigten für Insulin eine signifikant größere Clearance Rate als für Proinsulin und C-Peptid (KITABCHI, 1970; STARR et al., 1972). Der Proinsulin "Turn over" ist langsamer als der von Insulin (YU, 1973).

1.3. Die quantitative Erfassung des Proinsulins

Zur quantitativen Erfassung des Proinsulins in Pankreas und Serum des Menschen bediente man sich bisher der säulenchromatographischen Trennung von Insulin und Proinsulin mit anschließendem Radioimmunoassay der einzelnen Fraktionen (MELANI, RUBENSTEIN, STEINER, 1971; ROTH, GORDON, PASTAN, 1968). Dieser Weg der quantitativen Proinsulinmessung ist allerdings so aufwendig, daß es kaum möglich ist, ihn zu umfangreicheren Untersuchungen im klinischen Bereich zu verwenden.

Eine dem "Radioimmunoassay" für Insulin entsprechende Methode zur Proinsulinbestimmung konnte bisher nicht entwickelt werden, da man für jede Spezies von Proinsulin einen spezifischen Antikörper benötigen würde (ROOT et al., 1970). Es ist bisher nicht gelungen, einen für Humanproinsulin spezifischen Antikörper zu entwickeln.

Denkbar wäre auch ein "Radioimmunoassay" mit einem Antikörper gegen das C-Peptid, wenn nachgewiesen würde, daß Insulin und C-Peptid in äquimolarem Verhältnis in die Blutbahn abgegeben werden.

Da es bisher also nicht möglich ist, Proinsulin auf direktem Weg zu messen, bietet sich eine von BRUSH, KITABCHI und anderen entwickelte Methode an. Sie beruht auf der Entdeckung von BRUSH (1970), daß es möglich ist, aus Rattenskelettmuskel eine Protease mit hoher Spezifität für Insulin ("Insulin specific Protease") zu gewinnen. Proinsulin wird von dieser Protease nicht nennenswert angegriffen. Die Protease wurde auch in anderen Rattenorganen nachgewiesen (KITABCHI, STENTZ, 1972). KITABCHI et al. (1971) und BURGHEN et al. (1972) machten den Vorschlag zu einer Methode, mit der man Proinsulin radioimmunologisch messen kann, nachdem das Insulin durch Inkubation mit der Protease eliminiert worden ist.

1.4. Fragestellung

1. Welche Konzentrationen an insulinabbauender Protease (ISP) finden sich in Leber, Niere, Muskel und Milz der Ratte?
2. Welches Organ ist zur Anreicherung der ISP am geeignetsten?
3. Ist die hier beschriebene Anreicherung der ISP aus Rattenorganangewebe zur Proinsulinbestimmung für klinische Bedürfnisse ausreichend?
4. Welche Proinsulin-Konzentrationen finden sich beim nüchternen Probanden und nach Stimulation der β -Zelle mit Glukose und Tolbutamid?
5. Sind die mit der ISP-Methode erfaßten Proinsulin-Spiegel mit denen nach anderen Verfahren gemessenen vergleichbar?
6. Welche Bedeutung kommt dem Auftreten von Proinsulin in der Peripherie zu?

2. Methoden

2.1. Insulinbestimmung

2.1.1. Arbeitsprinzip der radioimmunologischen Insulinbestimmung

Die von uns angewandte Methode zur radioimmunologischen Insulinbestimmung geht im Prinzip auf YALOW und BERSON (1960) zurück und wurde von HALES und RANDLE (1963) und MORGAN und LAZAROW (1963) weiterentwickelt. Das Arbeitsprinzip ist folgendes : Das zu bestimmende unmarkierte Insulin reagiert im Wettbewerb mit einem später zugesetzten markierten Insulin (J^{125} -Insulin) um einen insulinspezifischen Antikörper (IBR). Wird nun die Konzentration des J^{125} -Insulins und des Antikörpers konstant, die Konzentration des nicht markierten Insulins aber variabel gehalten, dann ist das Verhältnis des an Antikörper gebundenen und des freien J^{125} -Insulins eine Funktion des nicht markierten Insulins.

2.1.2. Herstellung der Puffer und der Insulinstandardlösungen

Puffer A : 6,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 0,25 g Natriumäthylmercuriothiosalicylat
 5,0 g Rinderalbumin reinst ad 1000 ml aqua
 bidest. mit 2n NaOH auf pH 7,4 ein-
 stellen

Puffer B : 9,0 g NaCl
 ad 1000 ml Puffer A

Puffer C : 39,0 g Rinderalbumin
 ad 1000 ml Puffer A

Insulinstandard- lösungen

: Humaninsulin^x (2mE) + Puffer B in
7 verschiedenen Verdünnungen von
10 - 140 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin

^x "Insulin-Immunoassay-Kits" bestehend aus :
Humaninsulin, Insulin-Bindungsreagenz, (IBR), J^{125} -Insulin,
Membranfilter von: Fa. Amersham, Buckinghamshire, England;
Zellulose-Acetat Filter: Fa. Millipore, Neu Isenburg

2.1.3. Methodischer Ablauf der Insulinbestimmung

1. Das vorpräzipitierte insulinbindende Reagenz (IBR), welches in lyophilisierter Form vorliegt, wird ad 6 ml aqua bidest. gelöst. Diese Menge ist ausreichend für einen Ansatz mit 80 Einzelproben. Mit einer automatischen Pipette werden je 100 μ l IBR in die Reaktionsgefäße gegeben. Eine Waschkontrolle ohne Antikörper zur Kontrolle des Waschvorgangs wird mit 100 μ l Puffer A angesetzt.
2. Es werden je 100 μ l der zu untersuchenden insulinhaltigen Probe (für einen Nullversuch 100 μ l Puffer B) zugesetzt, und der Inhalt der Reaktionsgefäße wird mit einem Wirbelmischer gemischt.
3. Nach 6 Stunden werden je 100 μ l J^{125} -Insulin zugefügt, und es wird erneut gemischt.
4. Nach 18 Stunden wird das Präzipitat durch Mikrofiltration auf Membranfilterscheiben abgeschieden und die Reaktionsgefäße werden zweimal mit je 1 ml Puffer C nachgewaschen. Alle bisherigen Arbeitsgänge müssen bei 4°C durchgeführt werden.
5. Die Radioaktivität des abfiltrierten Präzipitats wird in einem Szintillationszähler^x bestimmt.
6. Zur Errechnung der Ergebnisse wird die Zählrate für jeden Versuch in Impulsen pro Minute ausgedrückt und die mittlere Impulsrate für jede Serie wird berechnet. Stark abweichende Meßwerte bei der von uns angewandten 3-fach Bestimmung werden außer Acht gelassen.
7. Zur Aufstellung einer Standardkurve werden die Impulsraten des gebundenen J^{125} -Insulins gegen die im selben Ansatz gemessenen bekannten Insulinkonzentrationen aufgetragen. Die Insulinkonzentration der unbekannten Proben läßt sich nun direkt an der Standardkurve ablesen.

^x Szintillationszähler: Tricarb 3375, Fa. Packard-Instruments, Frankfurt

2.2. Proinsulinbestimmung

2.2.1. Präparation des Calcium-Phosphat-Gels

Die Präparation des Tri-Calcium-Phosphat-Gels ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) erfolgt nach der Methode von KEILIN und HARTREE (1938). 150 ml Calcium-Chlorid Lösung (132 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pro l) werden ad 1600 ml Leitungswasser gelöst. Unter ständigem Rühren gibt man 150 ml Trisodium-Phosphat Lösung (152 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ pro l) dazu. Die Lösung wird mit Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt. Das Präzipitat wird 3 oder 4 mal durch Abgießen mit 15-20 ml Leitungswasser gewaschen. Zuletzt wird das Präzipitat mit destilliertem Wasser in der Zentrifuge gewaschen. Dann wird das Gel in einer kleinen Menge aqua dest. suspendiert und kann so bei 4°C im Dunkeln mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.2.2. Proteinbestimmung durch Extinktion bei 260 mp und 280 mp

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von WARBURG und CHRISTIAN (in DAWSON, ELLIOTT et al.). Die Extinktion einer adäquat verdünnten Proteinlösung wird bei 260 mp und bei 280 mp gemessen. Der Quotient E_{280}/E_{260} wird errechnet. Anhand einer Tabelle kann man mit Hilfe dieses Quotienten einen Faktor für die Kalkulation der Proteinkonzentration ablesen. Die Proteinkonzentration in mg/ml ergibt sich aus: $E_{280} \times \text{Faktor } 1/d$ (d bezeichnet die Küvettendicke).

2.2.3. Methode zur Gewinnung und Anreicherung der Insulin-abbauenden Protease (ISP) (siehe auch Tab. 1)

Als Ausgangsmaterial dienen weibliche, 200 g schwere Wista Ratten^x. Die Ratten erhalten Leitungswasser und Standard-

^x Versuchstierzucht Ivanovas, Kisselegg/Allgäu

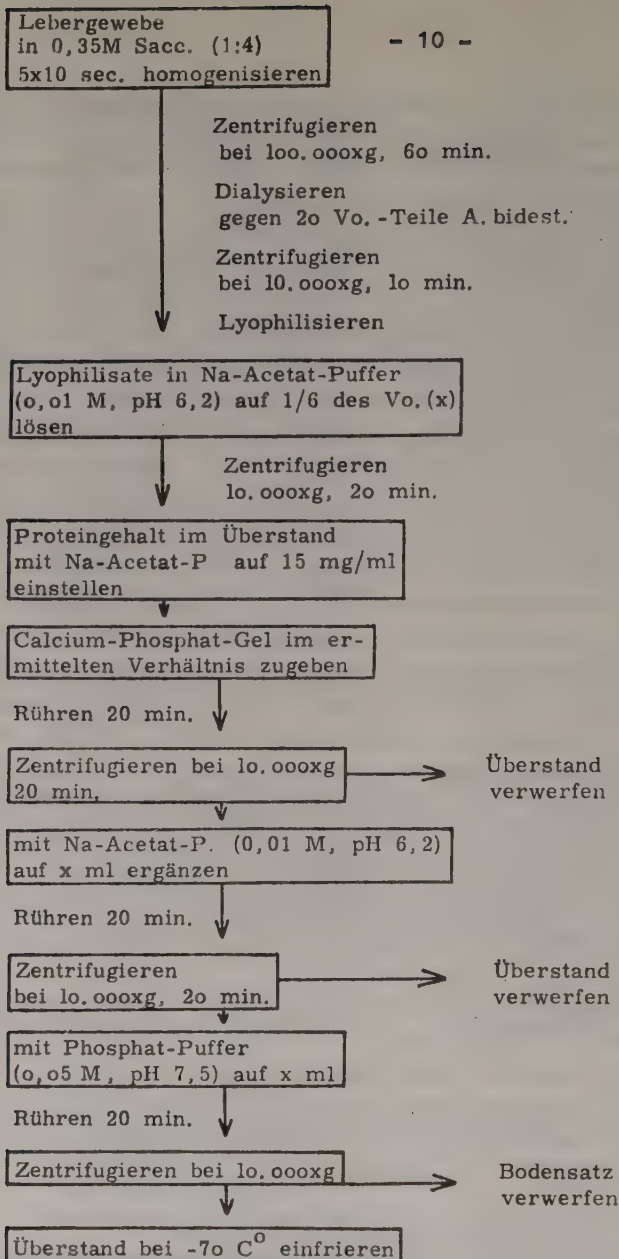
futter ad libitum. Die Ratten werden durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Die Hinterbeinmuskeln und die Leber werden herauspräpariert, von anhaftendem Gewebe gereinigt und in gekühlten Petrischalen aufbewahrt. Alle weiteren Arbeitsgänge werden bei 4°C (Eisbad oder Kältekammer) durchgeführt. Das Muskel- und Lebergewebe wird grob zerkleinert. Zu je 1,5 - 2,0 g Gewebe wird im Verhältnis 1:4 Saccharose-Lösung (0,33 M, 113 g Saccharose ad 1000 ml aqua dest.) gegeben. Dann wird bei maximaler Umdrehungszahl je 5 x 10 Sekunden homogenisiert^x. Es muß darauf geachtet werden, daß sich das Homogenat nicht erwärmt. Das Homogenat wird dann in der Ultrazentrifuge^{xx} bei 100.000 xg für eine Stunde zentrifugiert. Der Bodensatz wird verworfen, der Überstand wird gegen 20 Volumenteile deionisiertes Wasser 15 Stunden bei zweimaligem Wasserwechsel dialysiert. Das Dialysat wird bei 100.000 xg ultrazentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert, der Bodensatz wird verworfen. Das Lyophilisat wird in 0,01 M Natriumacetatpuffer, pH 6,2 (1,36 g C₂H₃O₂Na x 3H₂O ad 1000 ml aqua bidest., zu 996,5 ml dieser Lösung werden 3,5 ml 0,1 n Essigsäure gegeben) auf 1/6 bis 1/8 der Menge vor dem Dialysieren gelöst und bei 10.000 xg 20 Minuten ultrazentrifugiert. Der Bodensatz wird verworfen. Der Proteingehalt wird spektralphotometrisch (siehe 2.2.2.) bestimmt. Die Lösung wird mit 0,01 M Natriumacetatpuffer, pH 6,2, auf einen Proteingehalt von 15 mg/ml eingestellt. Das jetzt vorhandene Volumen wird in den weiteren Arbeitsgängen als "v" ml bezeichnet.

Calcium-Phosphat-Gel (siehe 2.2.1.) wird in einem als optimal ermittelten Verhältnis von Gel : Protein zu der Lösung gegeben. Das Gel-Protein Gemisch wird 20 Minuten gerührt und bei 10.000 xg 10 Minuten ultrazentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Gel wird mit 0,01 M Natriumacetatpuffer, pH 6,2, auf "v" ml ergänzt und abermals 20 Minuten gerührt und bei

^x Ultra-Turrex Homogenisator, 20.000 U/min.

Janke und Kunkel KG, Staufen im Breisgau

^{xx} Ultrazentrifuge, Beckmann und Spinco



Tab. 1 : Arbeitsgänge zur Anreicherung der
"Insulin spezifischen Protease" aus
Rattenleber

10.000 xg ultrazentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Gel mit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, (1,12 g KH_2PO_4 und 7,45 g Na_2HPO_4 ad 1000 ml aqua bidest.) auf "v" ml ergänzt. Dann wird abermals 20 Minuten gerührt und bei 10.000 xg ultrazentrifugiert. Das Gel wird verworfen, der Überstand wird sofort in Mengen von je 1 ml in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und kann bei -70°C längere Zeit aufbewahrt werden.

2.2.4. Messung von Proinsulin im menschlichen Serum

1. Zur Kontrolle der insulinabbauenden Aktivität der ISP wird mit Humaninsulin und Puffer B eine Standardlösung von 100 $\mu\text{E}/\text{ml}$ hergestellt.
2. Zu je 100 μl der Standardlösung und der zu bestimmenden Proben werden je 25 μl ISP gegeben.
3. Es wird mit einem Wirbelmischer gemischt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.
4. Zur Beendigung der Reaktion werden zu jeder Probe 25 μl 0,01 m Äthylmaleinimid (NEM) gegeben.
5. Nach abermaligem Mischen werden die Proben nach der oben beschriebenen Methode zur Insulinbestimmung weiterbehandelt. Es werden jetzt aber nur noch das Proinsulin und die proinsulinähnlichen Verbindungen gemessen.

2.3. Messung der Insulin-abbauenden Aktivitäten in Leber- und Muskelgewebe

Je 100 ml Patientenserum, Humaninsulin^x, reines Schweineinsulin^{xx} und Schweineproinsulin^{xx} sowie ein Gemisch aus diesen beiden wurden mit verschiedenen großen Mengen Gewebeextrakt

^x Humaninsulin : Fa. Amersham

^{xx} reines Schweineinsulin und Proinsulin :
Fa. Eli Lilly GmbH, Bad Homburg

von Leber und Muskel verschieden lange inkubiert. Zum Beenden der Reaktion nach der Inkubationszeit wurden je 25 μ l NEM verwendet.

Der weitere Ablauf der Messung entspricht der radioimmunologischen Insulinbestimmung.

2.4 Glukosestoffwechselbelastungen

2.4.1. Oraler Glukosebelastungstest mit 100 g Traubenzucker (OGTT)

Bei 13 Frauen und Männern (20 - 25 Jahre alt), die nach dem BROCA-Index kein Übergewicht und in der Familienanamnese keine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, wurde nach 3-tägiger kalorienreicher Kost eine orale Belastung mit 100 g Glukose (400 ml Dextro OGT[®]) durchgeführt. Nüchtern nach 30, 60, 120 und 180 Minuten wurden Insulin (TIR) und Proinsulin (IRP) im Serum gemessen.

2.4.2. Intravenöser Tolbutamid-Test (TOLT)

Bei 7 in gleicher Weise wie oben ausgesuchten und vorbehandelten Probanden wurde ein intravenöser Tolbutamid-Test, (1 g Rastinon[®] i.v.) durchgeführt. Vor der Injektion und 2, 5, 8, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach der Injektion wurde Blut zur Insulin- und Proinsulinbestimmung abgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Insulinabbauende Aktivitäten verschiedener Organhomogenate

In einer vorausgehenden Untersuchung in unserem Labor (HAUSMANN, KAMPS) wurde die Wirkung von vier verschiedenen Organhomogenaten auf Humaninsulin, Humanserum und Schweineproinsulin getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Inkubiert man Humaninsulin (100 μ E/ml) mit 25 μ l Rattenleberhomogenat, sieht man, daß schon nach 5 Minuten über 80 % des Insulins abgebaut und nach 20 Minuten ein Optimum der insulinabbauenden Wirkung erreicht ist. In der folgenden Zeit findet kein merklicher weiterer Abbau mehr statt. Der Insulinabbau durch Homogenate von Milz, Muskel und Niere geht zeitlich etwas langsamer vor sich und hat nach 30 Minuten noch kein Optimum erreicht. In Humanserum ist unter denselben Bedingungen der Insulinabbau weniger stark. Bei allen Organhomogenaten läßt sich nach 30 Minuten noch mehr als 20 % des Insulins wiederfinden. Die größte insulinabbauende Wirkung zeigen aber auch in Humanserum die Leberhomogenate. Inkubiert man Muskel- und Leberhomogenate mit Schweineproinsulin, zeigt sich, daß bei Muskelhomogenaten 10 %, bei Leberhomogenaten 30 % des Proinsulins radioimmunologisch nicht wiedergefunden werden können.

3.2. Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Gel zu Protein bei der Anreicherung der Protease

Wir haben versucht, die Homogenate durch Ca-Phosphat Gel Adsorption und Elution anzureichern. Für jede Gel Präparation muß eine optimale Menge Trockengel pro Milligramm Protein gefunden werden. Diese Menge Gel soll so bemessen sein, daß 90% des Enzyms vom Gel adsorbiert und 80 % eluiert werden (KITABCHI, STENTZ, 1972). Abb. 3 und Tab. 2 zeigen, daß bei der Gel Adsorption und Elution von Rattenleberdialysaten das optimale Verhältnis für das benutzte Gel bei 1,8 : 1 Gel : Protein

liegt. Es gelang uns nur mit Rattenleber befriedigende Ergebnisse bei der Anreicherung zu erzielen.

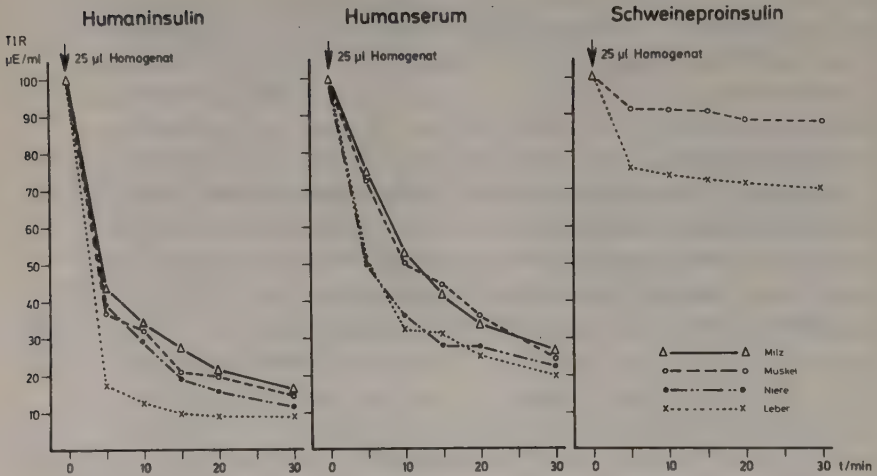


Abb. 1: Insulinabbauende Aktivitäten von Homogenaten (Leber, Niere, Muskel, Milz der Ratte) gegenüber Humaninsulin, Humanserum und reinem Schweineproinsulin bei verschieden langen Inkubationszeiten

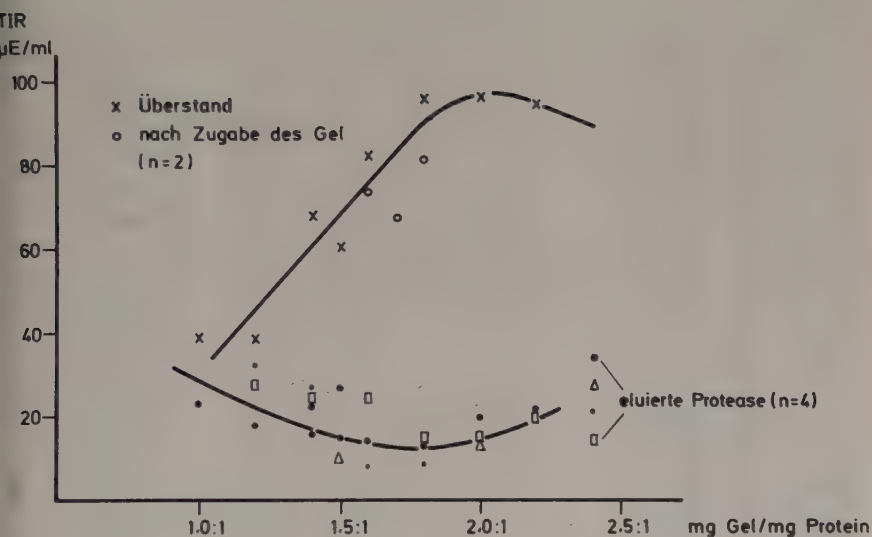


Abb. 2: Aktivität der eluierten Protease und des ersten Überstandes bei der Anreicherung über Ca-Phosphat Gel (zur Methode siehe 2.3.) gegen 100 μE Humaninsulin in Abhängigkeit vom Verhältnis Gel : Protein. Je 100 μl Humaninsulin wurden mit je 25 μl Testlösung 20 Minuten inkubiert.

Verhältnis Gel : Protein	eluierte Protease nach Inkubation mit 100 μ E Insulin	erster Überstand
0,5 : 1	45,0 μ E/ml TIR	25,0 μ E/ml TIR
1,0 : 1	22,5	39,0
1,2 : 1	18,0	41,5
1,4 : 1	16,0	68,5
1,5 : 1	15,5	61,0
1,6 : 1	14,5	83,0
1,7 : 1	12,5	97,0
1,8 : 1	13,5	96,5
2,0 : 1	20,0	95,0
2,2 : 1	22,5	94,5

Tab. 2 Aktivität der eluierten Protease und des ersten Überstands gegen 100 μ E Humaninsulin bei der Anreicherung über Calcium-Phosphat Gel in Abhängigkeit vom Verhältnis Gel : Protein. Je 100 μ l Humaninsulin wurden 20 Minuten mit der Testlösung inkubiert

3.3. Abbau von verschiedenen Insulinen durch die angereicherte Protease (ISP) in Abhängigkeit von der Zeit

In Abb. 4 und Tab. 3 ist dargestellt, wie verschiedene Insuline durch die über Calcium-Phosphat Gel angereicherte Protease aus Rattenleber gespalten werden. Reines Schweineinsulin wird durch 25 μ l ISP bis auf einen Rest, der unter 10 % liegt, abgebaut. Bereits nach 5 Minuten sind nur noch 20 % des Insulins auffindbar, nach 15-20 Minuten ist ein Optimum des Abbaus erreicht. Inkubiert man Humaninsulin (Fa. Buchler) mit ISP, so liegt der nicht zerstörte Anteil Insulin nach 20 Minuten etwa 5 % höher als bei reinem Schweineinsulin. Das Humaninsulin wird von der Herstellerfirma aber auch nicht als absolut rein deklariert. Nach der Inkubation von Humanserum mit 25 μ l ISP läßt sich nach 30 Minuten noch ein Rest von 20 % radioimmunologisch meßbarem Material finden. Dieser Anteil dürfte im wesentlichen dem im Humanserum vorhandenen Proinsulin entsprechen. Inkubiert man reines Schweineproinsulin mit 25 μ l ISP, so sind nach 5 Minuten etwa 7 % des Proinsulins zerstört. Mit zunehmender Inkubationszeit ändert sich dieser Anteil nicht mehr.

3.4. Abbau von verschieden großen Insulin- und Proinsulingehalten durch ISP

Reines Schweineinsulin und -Proinsulin wurde mit Humanalbuminpuffer (Puffer B) auf einen Gehalt von 25 - 400 μ E/ml verdünnt. Alle Proben wurden mit 25 μ l ISP 20 Minuten inkubiert. Abb. 5 und Tab. 4 zeigen, daß alle Insulinverdünnungen bis auf einen konstanten Rest von ca. 10 % abgebaut werden. Beim Proinsulin läßt sich bei den fünf verschiedenen Verdünnungen je ca. 5 % radioimmunologisch nicht wiederfinden. Abb. 4 verdeutlicht auch, daß 25 μ l ISP ausreichen, hohe Insulinwerte abzubauen.

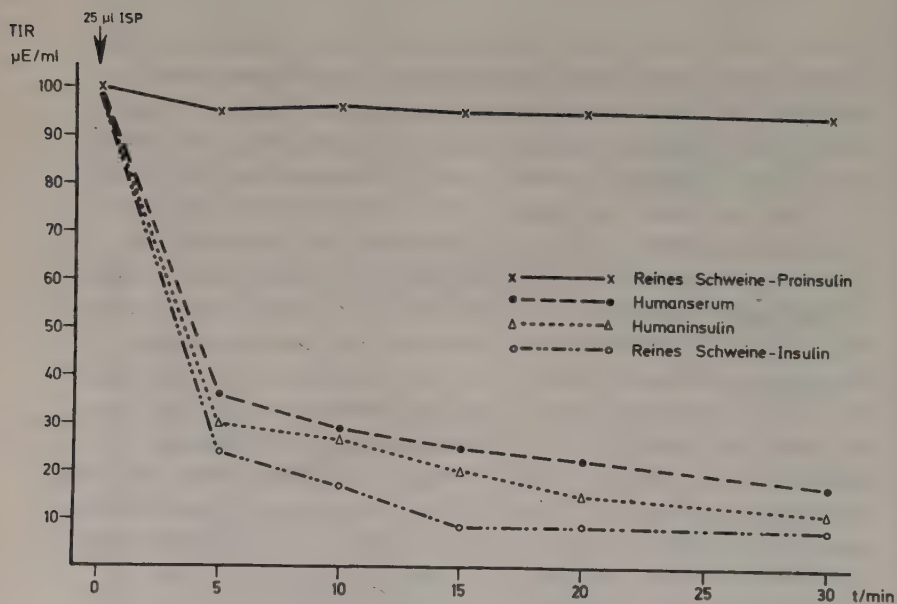


Abb. 3: Aktivität der insulinabbauenden Protease (ISP) aus Rattenleber gegenüber Humanserum, Humaninsulin, reinem Schweineinsulin und -Proinsulin in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Inkubationszeit		Humanserum	Humaninsulin	reines Insulin	reines Proinsulin
min.		uE/ml	uE/ml	uE/ml	uE/ml
0		100,0	100,0	100,0	100,0
5		36,0	30,0	24,0	92
10		29,0	27,0	17,0	93,0
15		25,0	20,5	9,5	92,5
20		22,5	15,0	9,5	92,5
30		17,0	11,5	9,0	92,0

Tab. 3 : Abbau verschiedener Insuline durch 25 μ l der "Insulin spezifischen Protease" (ISP) in Abhängigkeit von der Zeit

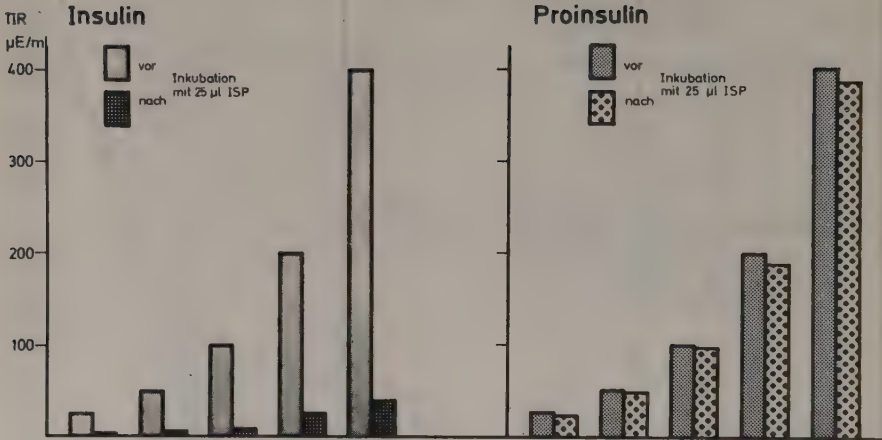


Abb. 4: Aktivität der insulinabbauenden Protease (ISP) gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von reinem Schweineinsulin und -Proinsulin bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten

IMI			IMP			% nicht abge- bautes Proinsulin
vor	nach	% nicht abge- bautes Ins.	vor	nach		
Inkubation mit ISP	Inkubation mit ISP		Inkubation mit ISP	Inkubation mit ISP		
25 uE/ml	2,5 uE/ml	10,0	25 uE/ml	23,0 uE/ml	92,5	
50	5,0	10,0	50	48,5	97,5	
100	8,0	8,0	100	98,5	98,5	
200	25,0	12,5	200	188,0	94,0	
400	42,0	10,5	400	386,0	96,5	

Tab. 4 Abbau von mit Humanalbuminpuffer verdünntem reinem Schweine - Insulin und - Proinsulin durch 25 µl ISP bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten

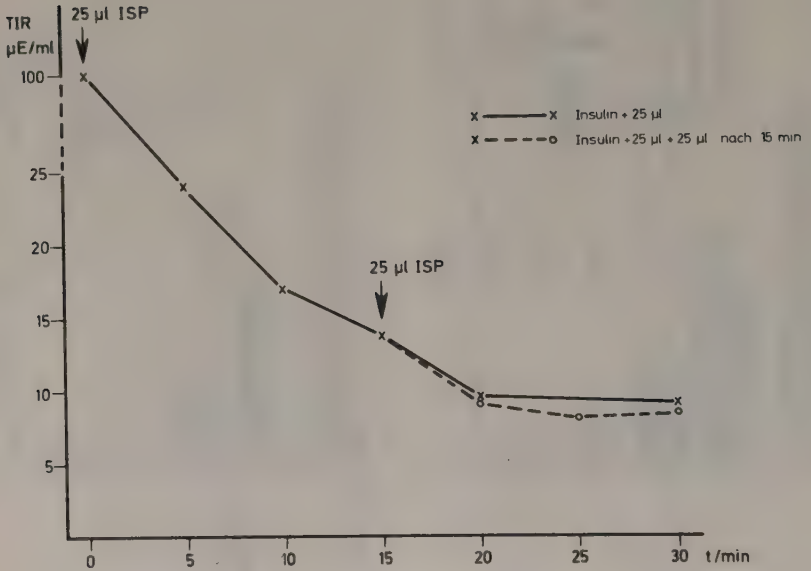


Abb. 5: Abbau von 100 μE eines reinen Schweineinsulins (100 $\mu\text{E/ml}$) durch 25 μl ISP in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Nach 15 Minuten wurde einer 2. Probe nochmals 25 μl ISP zugegeben.

TIR	IRP	%
500,0 μ E/ml	165,0 μ E/ml	33,0
250,0	85,0	37,0
150,0	55,0	36,6
100,0	32,0	32,0
75,0	24,5	32,7
50,0	16,5	33,0
25,0	8,5	34,0
12,5	5,0	40,0

Tab. 5: Insulin- (TIR) und Proinsulin-Gehalt (IRP) eines Humanserums, welches mit Humanalbuminpuffer unterschiedlich verdünnt wurde

3.5. Abbau von Insulin bei zeitlich versetzter zweimaliger Zugabe von ISP

100 ml reines Schweineinsulin (100 μ E/ml) wurde mit 25 μ l ISP inkubiert und nach 15 Minuten erfolgte nochmals die Zugabe von 25 μ l ISP. Abb. 6 zeigt, daß der Anteil des Restinsulins bei Verdopplung der ISP - Menge nicht weiter vermindert wird.

3.6. Bestimmung unterschiedlicher Proinsulingehalte in Humanserum

Ein Humanserum mit dem Insulingehalt von 500 μ E/ml TIR wurde nach der ISP - Methode auf seinen Proinsulingehalt untersucht. Das Serum wurde mit Humanalbuminpuffer (Puffer B) auf 7 unterschiedliche Insulingehalte verdünnt. Tab. 3 zeigt, daß der IRP - Gehalt des Serums von 33 % auch bei den Ver-

Probe	bestehend aus		Inkubation mit ISP	
	Insulin	Proinsulin	vor (TIR)	nach (IRP)
1	14,0	14,0	28,0	13,5
2	28,0	14,0	41,0	14,0
3	35,0	14,0	44,0	15,0
4	14,0	21,0	34,5	22,5
5	28,0	21,0	47,5	24,0
6	35,0	21,0	56,0	22,5
7	14,0	28,0	40,0	30,0
8	28,0	28,0	55,0	29,5
9	35,0	28,0	62,5	29,5

Tab. 6: Immunologisch meßbare Verbindungen in Proben mit einem bekannten Insulin- und Proinsulingehalt vor und nach Inkubation mit der ISP (Angaben in $\mu\text{E}/\text{ml}$)

dünnungen mit nur kleinen Abweichungen wiedergefunden werden kann.

3.7. Bestimmung des Proinsulingehalts von Mischungen mit bekanntem Insulin- und Proinsulingehalt

Reines Schweineinsulin und -Proinsulin wurde in 9 verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die Mischungen wurden vor und nach 20-minütiger Inkubation mit 25 μl ISP radioimmunologisch bestimmt. Tab. 6 zeigt, daß das in den Proben enthaltene Proinsulin mit der ISP - Methode für klinische Belange ausreichend genau wiedergefunden werden kann.

3.8. Insulin- und Proinsulingehalt beim oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) und beim Tolbutamid-Test

Nach oraler Gabe von 100 g Glukose kommt es zu einem Anstieg

des immunologisch meßbaren Insulins (TIR) mit einem Maximum zwischen 30 und 60 Minuten, nach 180 Minuten nähern sich die Werte wieder dem Ausgangspunkt. Das Proinsulin (IRP) zeigt, wie in Abb. 7 zu sehen ist, einen deutlich geringeren Anstieg im OGTT. Im Tolbutamid-Test weisen die Insulinspiegel (TIR) bereits nach 2 Minuten ein Maximum auf. Das Proinsulin (IRP) zeigt einen sehr flachen Kurvenverlauf mit einem maximalen Anstieg nach 2 Minuten.

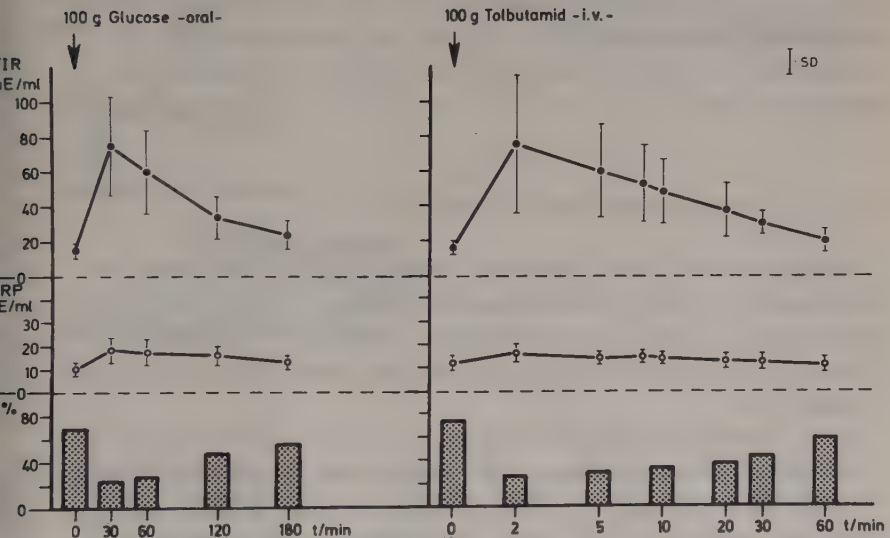


Abb. 6: Insulin (TIR) und Proinsulin (IRP) nach oraler Belastung mit 100 g Traubenzucker (n = 13) und i. v. Gabe von 1 g Tolbutamid (n = 7)

4. Diskussion

4.1. Abbauewege des Insulins

4.1.1. Insulinabbau durch Proteolyse

MIRSKY (1949) entdeckte, daß die biologische Aktivität von Insulin verlorenggeht, wenn es mit Gewebeextrakten von verschiedenen Rattenorganen (Leber, Muskel, Niere, Pankreas) inkubiert wird. Die Inaktivierung des Insulins führte er auf ein Enzymsystem zurück, daß er Insulinase nannte. Der Abbauvorgang des Insulins findet bei diesem ersten möglichen Weg durch Proteolyse statt, und zur Entfaltung der vollen proteolytischen Aktivität ist die Anwesenheit von freien Sulfhydrylgruppen erforderlich. Die MICHAELIS - MENTON - Konstante (K_m) des Leberenzymys für Insulin beträgt $0,08 \mu M$.

4.1.2. Insulinabbau durch Reduktion

Alternativ zum proteolytischen Abbaueweg wurde von TOMIZAWA und HALSEY (1959), NARAHARA und WILLIAMS (1959), TOMIZAWA, NUTLEY et al. (1955) und TOMIZAWA (1962) die Insulininaktivierung über die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (GIT) beschrieben.

Bei der reduktiven Spaltung wird Insulin in seine A- und B-Kette gespalten, indem die Reduktion der Disulfidbrücken von der GIT katalysiert wird (VARANDI, 1966; KATZEN und TIETZE, 1966). Die GIT wurde von VARANDI, TOMIZAWA (1965, 1966) und anderen ausgiebig erforscht und ist in verschiedenen Menschen- und Tierorganen charakterisiert und isoliert worden. Im Rattengewebe ist die GIT nach Untersuchungen von CHANDLER und VARANDI (1972) im Skelettmuskel, Herz, Hoden, Milz, Leber, Niere und Fettgewebe nachgewiesen worden. Es besteht offenbar ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Insulinempfindlichkeit eines Gewebes und seinem Gehalt an GIT. Als K_m für Insulin wurde für die Rattenleber $21 - 31 \mu M$,

für Rinderleber 50 μM und für Menschenleber 35 μM gefunden.

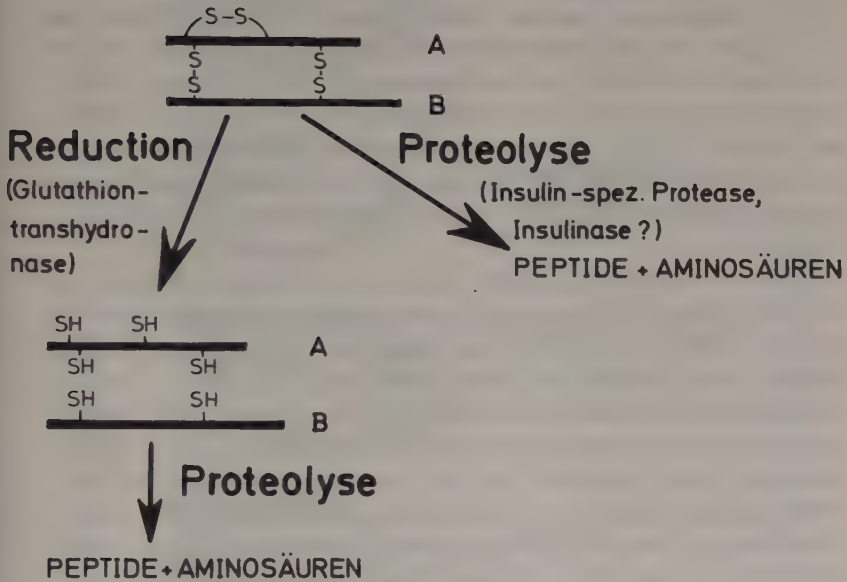


Abb. 7: Vereinfachtes Modell der Abbauege des Insulins nach THOMAS (1973)

4.1.3. Bedeutung der beiden Abbauege

KITABCHI und STENTZ (1972) fanden, daß die GIT im Gegensatz zur Insulinase nicht spezifisch für Insulin zu sein scheint, weil auch andere Disulfid enthaltene Gruppen durch die GIT abgebaut werden. Auch die exakte Lokalisation dieses Enzyms in verschiedenen Gewebshomogenaten ist noch nicht voll ge-

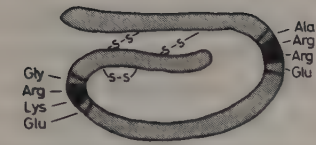
klärt. Auch VARANDI (1967) zweifelt die Spezifität dieses Enzyms an, da er bei in vitro Versuchen fand, daß die GIT in der Lage ist, aus einzelnen A- und B-Ketten wieder Insulin aufzubauen und somit die gespaltenen Disulfid-Brücken wiederherstellen kann. BURGHEN, KITABCHI und BRUSH (1972) fanden bei den von ihnen benutzten Gewebsfraktionen bei Zugabe von GSH keinen wesentlichen Anstieg der insulinabbauenden Aktivität und schließen daraus, daß nicht die GIT für den Insulinabbau verantwortlich sein kann. CHANDLER und VARANDI (1973) fanden hingegen bei Leberhomogenaten, aus denen die GIT durch Fällung mit Antikörpern spezifisch entfernt worden war, fast keine insulinabbauenden Aktivitäten mehr.

Sowohl die Transhydrogenase wie auch die möglicherweise verschiedenen Proteasen sind intrazelluläre Enzyme. Da das Plasma kein insulinabbauendes Enzym enthält (KITABCHI, DUCKWORTH, BRUSH, HEINEMANN, 1971) muß der Insulinabbau im Zytoplasma stattfinden. THOMAS (1973) postuliert, daß beide beschriebenen Enzymsysteme für den Insulinabbau eine gleich wichtige Rolle spielen. Die GIT mit dem relativ hohen Km funktioniert dann, wenn die Hormonkonzentration hoch ist. Die Protease mit dem niedrigen Km wirkt als ein feiner Kontrollmechanismus bei niedriger Insulinkonzentration.

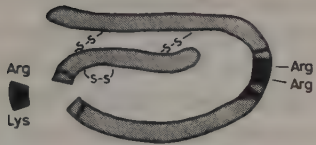
4.2. Verwendung des proteolytischen Abbauewegs zur quantitativen Proinsulinbestimmung

Ausgehend von den Erkenntnissen von MIRSKY und anderen reicherten BRUSH und CHENG (1968) aus Rattenskelettmuskel durch fraktionierendes Zentrifugieren und Calcium-Phosphat Gel Adsorption und Elution ein Enzym mit sehr hoher Spezifität für Insulin an (K_m 0,18 μM). In dem 100.000 xg Überstand wurden 96 % der gesamten insulinabbauenden Aktivität gefunden. Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt 80.000. BRUSH nannte dieses Enzym "Insulin specific Protease".

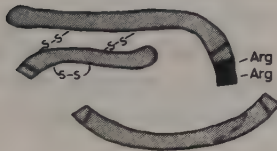
Die Protease spaltet Insulin zu immunologisch nicht meßba-



Proinsulin



**Desdipeptid-
Proinsulin**



**Diarginyl-Insulin
+ C - Peptid**



Insulin

(nach STEINER u.Mitarb.,1971)

Abb. 8: Zwischenstufen bei der Umwandlung von Insulin
in Proinsulin

ren, niedermolekularen Peptiden und Aminosäuren. Proinsulin und die proinsulinähnlichen Verbindungen wie Desdipeptid-Proinsulin, das als Zwischenstufe bei der Umwandlung von Proinsulin in Insulin auftritt, werden von der Protease nicht alteriert. Diarginyl-Insulin wird zu einer ähnlichen Rate wie Insulin abgebaut (KITABCHI, DUCKWORTH et al., 1971). Die "Insulin specific Protease" wurde auch in anderen Rattenorganen nachgewiesen und charakterisiert. Spezifität und Kinetik der ISP wurden ausführlich von BURGHEN, KITABCHI und BRUSH (1972) und DUCKWORTH, HEINEMANN, KITABCHI (1972) untersucht.

Bei der radioimmunologischen Insulinbestimmung werden außer Insulin auch das Proinsulin und die Intermediärinsuline erfaßt (TIR = "total immunoreactive material"). Wenn nun vorher die Proben mit der insulinabbauenden Protease (ISP) inkubiert werden, sind radioimmunologisch nur noch Proinsulin und proinsulinähnliche Stoffe meßbar. Schematisch ausgedrückt heißt das also : $TIR - IRI = IRP$ (IRI, IRP = "immunoreactive Insulin bzw. Proinsulin").

4.3. Methodische Betrachtungen

4.3.1. Auswahl des Organs

BRUSH (1970) benutzte in seiner ersten Untersuchung Rattenskelettmuskel als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der insulinabbauenden Protease. KITABCHI und STENTZ (1972) untersuchten systematisch Homogenate von verschiedenen Rattenorganen auf ihre insulinabbauende Aktivität. Die Ergebnisse zeigen, daß Homogenate von Rattenleber vor Pankreas, Niere, Milz, Muskel und anderen Organen die größte insulinabbauende Aktivität aufweisen. Unsere mit Homogenaten und Zentrifugaten verschiedener Rattenorgane durchgeführten Untersuchungen (HAUSMANN, KAMPS) decken sich im wesentlichen mit den Ergebnissen der vorhergenannten Untersuchung (siehe auch Abb. 2).

KITABCHI und STENTZ (1972) fanden, daß durch die Homogenate von Leber, Pankreas und Niere fast 40 % Proinsulin, durch Herz, Muskel und Lunge etwa 15 % Proinsulin zerstört wird. Die Untersuchungen in unserem Labor zeigten ebenfalls, daß durch die Homogenate und Zentrifugate ein relativ hoher Anteil Proinsulin zerstört wird. Im Gegensatz dazu waren nach Inkubation von reinem Schweineproinsulin mit unserem aus Rattenleber gewonnenen, angereicherten Enzym nur noch etwa 7 % Proinsulin radioimmunologisch nicht mehr auffindbar.

In den meisten Organhomogenaten ist zwar eine ausreichende insulinabbauende Aktivität vorhanden, aber Proinsulin wird ebenfalls in einem zu hohen Maß angegriffen. BRUSH, KITABCHI und andere reicherten sowohl aus Rattenskelettmuskel wie auch aus Rattenleber eine Protease an, die Proinsulin nur in äußerst geringem Maß angreift. Uns gelang es nur von Rattenleber ausgehend eine Protease anzureichern, die die geforderten Bedingungen erfüllt. Aus Rattenmuskel war es uns nicht möglich, eine adäquat wirkende Protease herzustellen.

4.3.2. Calcium-Phosphat Gel Adsorption und Elution

Bei der Anreicherung der Organhomogenate über Calcium-Phosphat Gel gingen wir im wesentlichen nach der von BRUSH (1970) angegebenen Methode vor. Die Proteinkonzentration des in Puffer gelösten Lyophilisats stellten wir auf 15 mg/ml statt auf 10 mg/ml ein, da wir so bessere Ergebnisse erzielten. Die größte Mühe bereitete es, das optimale Gel:Protein Verhältnis zu ermitteln. Es ist aus mehreren Gründen nicht möglich, ein bestimmtes Gel:Protein Verhältnis für die hier angewandte Methode anzugeben. Bei der Enzymreinigung durch Tri-Calcium-Phosphat-Gel (Hydroxylapatit) Adsorption und Elution handelt es sich um eine empirische Methode, bei deren Anwendung bekannte physikalische und chemische Eigenschaften des zu reinigenden Proteins nicht weiterhelfen. Bei der positiven Adsorption benutzt man die kleinstmöglich-

che Menge des Adsorbens, welche 80 % oder mehr des gesuchten Proteins festhalten soll. Die Proteinkonzentration soll 1 % oder weniger betragen, das Gel:Protein Verhältnis kann von 0,1 - 2,0 : 1 variieren. Die Salzkonzentration soll gering sein, dialysierte Lösungen sind zu bevorzugen. Die Adsorption soll bei pH-Werten von 5,0 - 6,0, die Elution bei pH-Werten von 7,0 - 9,0 vorgenommen werden (COLOWICK, KAPLAN, 1957). Über das Alter des zu verwendenden Gels gibt es verschiedene Meinungen. BRUSH (1970) und KITABCHI, STENTZ (1972) empfehlen für die hier beschriebene Methode die Verwendung von frisch präpariertem Gel, möglichst nicht älter als 14 Tage. Sie wiesen auch darauf hin, daß das optimale Gel:Protein Verhältnis für jede neue Gelpräparation neu bestimmt werden muß.

Wir benutzten nur frisch präpariertes Gel und für jede Charge wurde das optimale Gel:Protein Verhältnis neu ermittelt. Zur Proinsulinbestimmung verwandten wir nur die Eluate, bei denen die Gelmenge so bemessen war, daß 90 % der insulinabbauenden Protease vom Gel adsorbiert und 80 % wieder eluiert wurden (BRUSH, 1970). Wir fanden außerdem, daß sich bei Verwendung derselben Charge Gel das optimale Gel:Protein Verhältnis ändert, wenn die Ausgangsmenge der Proteinlösung variiert wird.

4.3.3. Radioimmunologische Insulin- und Proinsulin-Bestimmung

Die ISP in dem hier verwandten Reinheitsgrad zeigt in Konzentrationen bis zu 50 µg Protein pro 250 µl Inkubationsmischung keine Beeinflussung des Radioimmunoassays (KITABCHI et al., 1971). Es besteht auch kein Unterschied zwischen der Abbaurate von radioaktiv markiertem Insulin und unmarkiertem Insulin (BRUSH, 1970). Dies wurde in Versuchen nachgewiesen, bei denen das Gesamtinsulin konstant gehalten und der Anteil von markiertem und unmarkiertem Insulin variiert wurde.

Das Enzym wird durch die Sulfhydryl-Reagenzien NEM und p-HMB gehemmt. Verschiedene andere Methoden erwiesen sich als nicht effektiv. Die Konzentration von NEM wird kritisch, wenn sie höher als 0,01 M ist, da es dann zu Interferenzen mit dem Radioimmunoassay kommen kann (BRUSH, 1970).

Die ISP hat nach Untersuchungen von KITABCHI et al. ein enges pH-Optimum bei pH 7,4 - 7,6. Die Aktivität der ISP fällt stark ab bei pH-Verschiebungen zur alkalischen Seite. Wir haben die ISP mit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, nach der Anreicherung über das Gel eluiert. Die beim Radioimmunoassay benutzten Puffer sind auf pH 7,4 eingestellt.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit menschlichen Proinsulins und zur Vereinfachung der Methode haben wir zur Berechnung der Insulin- und der Proinsulinwerte eine Humaninsulin-Standard-Kurve verwandt. Da der beim Radioimmunoassay benutzte Schweineinsulinantikörper gegen Proinsulin nur $1/4$ bis $1/3$ der immunologischen Empfindlichkeit wie gegen Insulin besitzt, wird auf diese Weise sowohl das Gesamtinsulin (TIR) als auch das isoliert gemessene Proinsulin deutlich unterbestimmt. Die absoluten Proinsulinspiegel liegen also höher, als die so gewonnenen Ergebnisse zeigen. Für die Bestimmung der absoluten Proinsulinspiegel müßte eine Proinsulin-Standard-Kurve verwandt werden. Die anhand einer solchen Standardkurve berechneten Proinsulinwerte würden niedriger liegen als die nach einer Insulin-Standard-Kurve bestimmten.

4.4. Eignung der angereicherten Protease für klinische Bedürfnisse

Um festzustellen, ob die ISP im Humanserum eine genügende Aktivität entfaltet, verglichen wir den Insulinabbau in Humanserum, Humaninsulin und reinem Schweineinsulin. Die Ergebnisse zeigen, daß die ISP anscheinend durch Serumbestandteile in ihrer Aktivität behindert wird. Der Insulinabbau, welcher in gepufferter Lösung schon nach 10 Minuten ein Ma-

ximum erreicht, erfolgt im Serum zeitlich etwas verzögert und erreicht später sein Maximum. Auch BRUSH (1971) fand, daß der Insulinabbau durch die ISP in Boratpuffer schneller stattfindet als im Serum. Wir haben deshalb die Inkubationszeit von 15 auf 20 Minuten erhöht und so erreicht, daß auf jeden Fall ein genügender Insulinabbau gewährleistet ist. Die Proinsulinabbaurate von maximal 10 % erfährt auch bei verlängerter Inkubationszeit keine Steigerung.

Um zu prüfen, ob 25 µl ISP auch bei hohen Insulinspiegeln einen optimalen Insulinabbau gewährleisten, verglichen wir die prozentuale Abbaurate bei Insulinspiegeln von 25 - 400 µE/ml TIR. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität von 25 µl ISP ausreicht, die im klinischen Versuch zu erwartenden Insulinmengen abzubauen.

Weiterhin untersuchten wir anhand eines Humanserums, welches mit Humanalbuminpuffer in 8 Stufen von 500 - 12,5 µE/ml TIR verdünnt war, die Meßgenauigkeit der ISP-Methode im Serum. Der gemessene prozentuale Proinsulingehalt schwankte von 32,0 - 40,0 %, was für klinische Bedürfnisse ein befriedigendes Ergebnis sein sollte.

Eine ausreichende Meßgenauigkeit der ISP-Methode sahen wir auch beim Wiederfinden einer vorgegebenen Proinsulinmenge aus verschiedenen Insulin-Proinsulin-Gemischen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die von uns durchgeführte Anreicherung der Protease ausreichend ist, um Proinsulinbestimmungen im klinischen Bereich durchzuführen.

4.5. Vergleich der mit der ISP-Methode gemessenen Proinsulinwerte mit denen nach anderen Methoden bestimmten Werten

4.5.1. Proinsulin beim nüchternen Probanden

Die ersten Proinsulinbestimmungen an gesunden, nüchternen Probanden wurden nach der säulenchromatographischen Methode (Alkohol-Extraktion des Serums und anschließende Gel-Filtration über Sephadex®) durchgeführt. MELANI, RUBENSTEIN,

STEINER (1970) fanden Proinsulinanteile im Serum von 5-48% am Gesamtinsulin (TIR). Untersuchungen anderer Autoren nach der säulenchromatographischen Methode ergaben vergleichbare Ergebnisse (YIP, 1971; BAIRD, 1971; CLARK, STEINER, 1969). Bei den Studien, bei denen ein Humaninsulinstandard sowohl zur Messung des Insulins als auch des Proinsulins benutzt wurde, schwanken die prozentualen Proinsulinanteile im Serum von 20 - 75 % am TIR. Wenn man davon ausgeht, daß die absoluten Proinsulinspiegel noch höher liegen, kann man sagen, daß Proinsulin den größten Anteil am TIR bei nüchternen Patienten hat. Wir fanden in unserer Untersuchung, daß der Proinsulinanteil beim nüchternen Probanden etwa 70 % beträgt. KITABCHI, DUCKWORTH et al. (1971) fanden nach der ISP-Methode bei nüchternen Probanden Proinsulinanteile von 26 - 75 %. Eine Erklärung für diese Befunde könnte sein, daß Insulin eine niedrigere Halbwertszeit als Proinsulin hat (SÖNKSEN, TOMKINS et al., 1973; STOLL, TOUBER et al., 1971).

Beim direkten Vergleich der ISP-Methode mit der säulenchromatographischen fanden KITABCHI und DUCKWORTH eine genügende Übereinstimmung in den Ergebnissen. CRESTO, LAVINE, FINK und RECENT (1974) fanden beim Vergleich der beiden Methoden bei Anwendung der ISP-Methode höhere Proinsulinspiegel. Sie konnten jedoch eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen feststellen. Die von CRESTO et al. benutzte enzymatische Methode ist allerdings nicht identisch mit der von uns angewandten Methode, da sie eine geringer angereicherte Protease benutzten.

Zur Erklärung der nach der ISP-Methode möglicherweise höheren Proinsulinspiegel kann dienen, daß die proinsulinähnlichen Stoffe Desdipeptid- und Desnonapeptidproinsulin mitgemessen werden, vorausgesetzt, daß diese Stoffe ähnlich wie Proinsulin mit dem Schweineinsulinantikörper reagieren. Vielleicht führen auch die bei der säulenchromatographischen Methode notwendigerweise größeren Manipulationen zu niedrigeren Ergebnissen.

4.5.2. Proinsulin beim oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Als Beispiel für die Anwendung der ISP-Methode im klinischen Bereich haben wir Proinsulin beim oralen Glukose-Toleranz-Test gemessen. In älteren Untersuchungen nach der säulenchromatographischen Methode konnte der OGTT aufgrund des methodischen Aufwands nur bei einer sehr geringen Anzahl von Probanden durchgeführt werden. GORDON und ROTH (1969) fanden, daß nach oraler Glukose-Belastung der prozentuale Proinsulinanteil von weniger als 5 % nach 15 - 30 Minuten auf 5 - 30 % nach 90 - 120 Minuten ansteigt. MELANI, RUBENSTEIN, STEINER (1970) fanden bei einigen Probanden schon nach 30 Minuten maximale Proinsulinanstiege. Wir haben bei 13 Probanden Proinsulin nach der ISP-Methode beim OGTT gemessen. Wir fanden einen im Vergleich zum Gesamtinsulin nur sehr geringen Proinsulinanstieg, der nach 30 Minuten ein Maximum erreichte und sich von da an langsam wieder dem Ausgangswert näherte. Nach 30 Minuten konnten absolute Proinsulinspiegel von ca. 20 μ E/ml gemessen werden. Der prozentuale Proinsulinanteil am Gesamtinsulin von 70 % beim nüchternen Probanden fällt im OGTT nach 30 Minuten auf ca. 20 % ab. DUCKWORTH, KITABCHI, HEINEMANN (1972) untersuchten nach der ISP-Methode Patientenkollektive von 20 - 30 Personen und fanden bei gesunden Probanden im OGTT die höchsten Proinsulinspiegel nach 120 - 180 Minuten. Es wurden absolute Proinsulinspiegel von 10 - 20 μ E/ml als Höchstwerte bei den Probanden gemessen.

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen kann man ableiten, daß es nach Glukose-Belastung zu einem verstärkten "Output" von Insulin bei kaum veränderter Proinsulin-Sekretion kommt.

4.5.3. Proinsulin beim Tolbutamid-Test (TOLT)

Wir haben bei 7 Patienten nach intravenöser Applikation von

1 g Tolbutamid Proinsulin im Serum gemessen. Beim Tolbutamid-Test erreichen die Insulinwerte ähnlich hohe Spiegel wie nach oraler Glukose-Belastung. Der von uns gemessene Proinsulinanstieg ist deutlich geringer als im OGTT, und schon nach 2 Minuten wird ein Maximum erreicht. Der prozentuale Anteil des Proinsulins am Gesamtinsulin fällt ähnlich wie nach oraler Glukose-Belastung stark gegenüber dem Ausgangswert ab.

DUCKWORTH, HEINEMANN, KITABCHI (1970) und DUCKWORTH, SOLOMON, KITABCHI (1972) fanden beim Tolbutamid-Test unter Verwendung der ISP-Methode einen nur geringfügigen Proinsulinanstieg, der erst etwa nach 45 Minuten p.I. ein Maximum erreichte. Andere vergleichbare Proinsulinmessungen beim Tolbutamid-Test sind bisher nicht durchgeführt worden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann man ableiten, daß es unter physiologischer Belastung (Glukose oral) eher zu einer vermehrten Proinsulinsekretion als unter "unphysiologischer" wie im Tolbutamid-Test kommt.

4.6. Zur Bedeutung des Auftretens von Proinsulin in der Peripherie

Seit dem Nachweis von Proinsulin im Serum des Menschen ging man der Frage nach, ob dem Proinsulin eine biologische Bedeutung beizumessen ist, oder ob das Auftreten von Proinsulin in der Peripherie nur eine passive Konsequenz der Insulinbiosynthese in den β -Zellen des Pankreas ist.

Unsere Untersuchung hat gezeigt, daß Proinsulin beim nüchternen Probanden prozentual einen höheren Anteil am Gesamtinsulin hat als nach Stimulation der β -Zellen. Außerdem besteht ein Unterschied zwischen den absoluten Proinsulinspiegeln nach physiologischer Belastung (Glukose oral) und unphysiologischer (Tolbutamid i.v.). Daraus kann man ableiten, daß Proinsulin auf verschiedene Reize unabhängig vom Insulin reagiert und so also nicht nur passive Konsequenz der Insulinbiosynthese sein kann.

Frühere Studien über die biologische Aktivität von Proinsulin verglichen mit der von Insulin zeigten, daß Proinsulin nur einen Bruchteil (ca. 2 %) der Insulinaktivität in der Peripherie besitzt (GLIEMANN, SØRENSEN, 1970; GRANT, REID, 1968). REES und MADISON (1969) berichteten, daß trotz der schwachen biologischen Aktivität im peripheren Fettgewebe Schweineproinsulin bei der Maus einen gleich starken Einfluß wie Insulin auf den Glukose-Output in der Leber hat.

Auf Grund der von uns und anderen Autoren gefundenen hohen basalen Proinsulinspiegel könnte man nun vermuten, daß dem Proinsulin eine Bedeutung im Ruhestoffwechsel zukommt. Vielleicht hemmt Proinsulin die Gluconeogenese in der Leber, während es zur selben Zeit die periphere Glukoseverwertung nur minimal stimuliert? Vielleicht besetzt auch Proinsulin im Ruhestoffwechsel die Insulinrezeptoren, um so den Organismus vor einer möglichen Insulinwirkung zu schützen?

Bevor nicht weitere Untersuchungen über diesen Themenkomplex durchgeführt worden sind, kann man wohl noch keine klare Aussage über die biologische Bedeutung des Proinsulins machen.

4.7. Perspektive der Proinsulinbestimmung nach der ISP-Methode

Man war bisher nicht in der Lage, eine der radioimmunologischen Insulinbestimmung entsprechende Methode für Proinsulin zu entwickeln. Ein Problem besteht darin, daß man bisher keinen für Proinsulin spezifischen Antikörper gewinnen konnte, der nicht auch mit den Intermediärinsulinen und dem C-Peptid reagiert (RUBENSTEIN, MELANI, PILKIS, STEINER, 1969). Weiterhin haben Untersuchungen verschiedener Autoren (GUTMAN, LAZARUS et al., 1971; GORDON, ROTH, 1969; RUBENSTEIN, CHO et al., 1969; KUMAR, MILLER, 1973) gezeigt, daß man für ein optimales Radioimmunoassay für jede Spezies von Proinsulin einen spezifischen Antikörper benötigen würde. Solange also

eine radioimmunologische Proinsulinbestimmung im menschlichen Serum nicht möglich ist, bietet sich die ISP-Methode als geeignetes Verfahren an, mit vergleichbar geringem Aufwand umfangreiche Proinsulinmessungen im klinischen Bereich durchzuführen.

5. Zusammenfassung

Proinsulinbestimmungen im menschlichen Serum sind von besonderem Interesse, da bisher nicht hinreichend geklärt ist, welche Rolle Proinsulin im menschlichen Stoffwechsel spielt. Es wird untersucht, wie gut eine aus Rattenorgangewebe angereicherte insulinabbauende Protease geeignet ist, Proinsulinmessungen in größerem Umfang durchzuführen. In Homogenaten von frischem Rattenorgangewebe wurden die höchsten Konzentrationen an insulinabbauender Aktivität in der Leber gefunden. Nach fraktionierendem Ultrazentrifugieren, Dialysieren und Lyophilisieren wurden Leber- und Muskelgewebe mit einem Calcium-Phosphat Gel angereichert. Befriedigende Ergebnisse wurden nur bei der Anreicherung von Lebergewebe erzielt. Die aus Rattenlebergewebe angereicherte Protease (ISP) baut reines Schweineinsulin bis auf einen Rest von ca. 9 % in radioimmunologisch nicht meßbare Spaltprodukte ab. Reines Schweineproinsulin wird von der ISP nur zu ca. 7 % alteriert. Mit Hilfe dieser Protease gemessene Proinsulin-Werte sind ausreichend reproduzierbar und entsprechen weitgehend denen, die nach der säulenchromatographischen Methode ermittelt worden sind. Die hier beschriebene Anreicherung der insulinabbauenden Protease ist für Proinsulinbestimmungen im klinischen Bereich ausreichend.

Bei 13 nüchternen Probanden wurden nach der ISP-Methode Proinsulinanteile von ca. 70 % am Gesamtinsulin im Serum gefunden. Nach Stimulation der β -Zelle mit Glukose und Tolbutamid findet sich nur ein geringfügiger Anstieg der absoluten Proinsulinspiegel, der prozentuale Anteil des Proinsulins am Gesamtinsulin fällt stark ab.

Solange es nicht möglich ist, mit einem proinsulinspezifischen Antikörper radioimmunologische Proinsulinbestimmungen durchzuführen, scheint die hier beschriebene ISP-Methode für umfangreiche Proinsulinmessungen im menschlichen Serum geeignet zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Ansorge, S., : Metabolism of insulin and glu-
Bohley, P., cagon breakdown of radioiodina-
Kirschke, H., ted insulin and glucagon in rat
Langner, J., liver cell fractions.
Hanson, H. European J. of Biochemistry 19
(1973) 283
2. Baird, N. : In Vitro Regulation of Proinsu-
lin Synthesis in Isolated Rat
Islets.
Diabetes 20 (1971) Suppl. 1, 332
3. Brush, J.S. : Purification and characterization
of a new protease with specificity
for insulin from rat muscle.
Diabetes 20 (1970) 140-145
4. Brush, J.S., : Purification and properties of a
Cheng, E.W.K. new insulin-degrading enzyme in
rat skeletal muscle.
Fed. Proc. 27 (1968) 495
5. Burghen, G.A., : Purification and properties of a
Kitabchi, A.E., rat liver protease with specificity
Brush, J.S. for insulin.
Endocrinology 91 (1972) 633-642
6. Chajek, T., : Biologic activity of proinsulin
Tannenbaum, R., in an isolated fat-cell-system.
Shapira, E., Israel J. Med. Sci. 8 (1972) 754
Spitz, I.,
Russell, A.,
Rabin, D.
7. Chance, R.F. : Amino acid sequence of proinsulin
and intermediates.
Diabetes 21 (1972) Suppl. 2,
461-462

8. Chance, R.F., Ellis, R.M., Bromer, W.W. : Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence. Science 161 (1968) 165-166
9. Chandler, M.L. Varandi, P.T. : Insulin degradation II: The widespread distribution of glutathione-insulin transhydrogenase in the tissue of the rat. Biochem. Biophys. Acta 286 (1972) 136-145
10. Chandler, M.L., Varandi, P.T. : Insulin degradation VIII: Protein thiols as co-substrats for glutathione-insulin transhydrogenase. Biochem. Biophys. Acta 320 (1973) 258-266
11. Clark, J.L., Cho, S., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F. : Isolation of a proinsulin connecting peptide fragment (C-peptide) from bovine and human pancreas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969) 456-461
12. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. : Methods in Enzymology. Academic Press, New York Vol. I (1955) p. 98
13. Cresto, J.C., Lavine, R.L., Fink, G., Recant, L. : Plasma proinsulin: Comparison of insulin specific protease and gel filtration assays. Diabetes 23 (1974) 505-511
14. Dawson and Elliott : Data for Biochemical Research, Oxford University Press, Glasgow (1969) p. 617
15. Duckworth, W.C., Heinemann, N., Kitabchi, A.E. : Effect of glucose and tolbutamide on plasma proinsulin and insulin of dogs. Clin. Res. 18 (1970) 601

16. Duckworth, W.C., : Purification of insulin specific
Heinemann, M., protease by affinity chromatogra-
Kitabchi, A.E. phy.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972)
3698-3702
17. Duckworth, W.C., : Direct measurement of plasma pro-
Kitabchi, A.E. insulin in normal and diabetic
subjects.
Amer. J. Med. 53 (1972) 418-427
18. Duckworth, W.C., : Effect of chronic sulfonylurea
Solomon, S.S., therapy on plasma insulin and pro-
Kitabchi, A.E. insulin levels.
J. Clin. Endocrin. Metab. 35 (1972)
585-591
19. Gliemann, J., : Assay of insulin-like activity by
Sørensen, H.H. the isolated fat cell method.
IV. The biological activity of
proinsulin.
Diabetologia 6. 499-504
20. Goldsmith, S.T., : Significance of human plasma in-
Yalow, R.S., sulin Sephadex fractions.
Berson, S.A. Diabetes 18 (1969) 834-839
21. Gordon, P., : Fluctuations in the "big" insulin
Roth, J. component in man after glucose
and other stimuli.
J. Clin. Invest. 48 (1969) 2225-
2234
22. Grant, P.T., : Biosynthesis of an insulin precu-
Reid, K.B.M. sor by islet tissue of cod.
Biochem. J. 110 (1968) 281-288
23. Gutman, R., : Circulating proinsulin-like mate-
Lazarus, A., rial in patients with functioning
Penhos, J.C., insulinoma.
Recant, L. New Engl. J. Med. 284 (1971) 1003-
1008

24. Gutman, R.A., : Electrophoretic characterization
Lazarus, N.R., of circulating human proinsulin
Recant, L. and insulin.
Diabetologia 8 (1972) 136-140
25. Hales, C.N., : Double Antibody Method.
Randle, P.J. Lancet 200 (1963)
Biochem. J. 88 (1963) 137-146
26. Katz, A.I., : Metabolism of proinsulin, insulin
Rubenstein, A.H. and C-peptide in the rat.
J. Clin. Invest. 52 (1973) 1113-
1121
27. Katzen, H.M., : Studies of the specificity and me-
Tietze, F. chanism of action of hepatic glu-
tathione-insulin transhydrogenase.
J. Biol. Chem. 241 (1966) 3561-
3570
28. Keilin, D., : Preparation of calcium phosphate
Hartree, E.F. gel.
Proc. R. Soc., B 124 (1938) 397
29. Kemmler, W., : On the transformation of proinsu-
Peterson, J., lin to insulin in vitro and in
Borg, J., vivo.
Nehrlich, S., Diabetes 20 (1971) Suppl. 1, 332
Steiner, D.F.
30. Kitabchi, A.E. : The biological and immunological
properties of pork and beef insu-
lin, proinsulin and connecting
peptides.
J. Clin. Invest. 49 (1970) 979-
987
31. Kitabchi, A.E., : Direct measurement of proinsulin
Duckworth, W.C., in human plasma by the use of an
Brush, J.S., insulin-degrading protease.
Heinemann, M. J. Clin. Invest. 50 (1971) 1792-
1799

32. Kitabchi, A.E., : Degradation of insulin and proin-
Stentz, F.B. sulin by various organ homogenates of rat.
Diabetes 21 (1972) 1091-1101
33. Kumar, D., : Proinsulin-specific antibodies in
Miller, L.V. human sera.
Diabetes 22 (1973) 361-366
34. Lazarus, N.R., : Synthesis and release of proinsu-
Tanese, T., lin and insulin by human insuli-
Gutman, R., noma tissue.
Recant, L. J. Clin. Endocrin. Metab. 30 (1970)
273-281
35. Melani, F., : Identification of proinsulin and
Rubenstein, A.H., C-peptide in human serum with a
Oyer, P.E., specific immunoassay.
Steiner, D.F. Proc. Nat. Acad. Sci. 67 (1970)
148-155
36. Melani, F., : Human serum proinsulin.
Rubenstein, A.H., J. Clin. Invest. 49 (1970) 497-507
Steiner, D.F.
37. Melani, F., : Proinsulin and C-peptide in human
Rubenstein, A.H., serum.
Steiner, D.F. Handbuch des Diabetes mellitus,
Vol. II (1971)
38. Melani, F., : Proinsulin secretion by a pancre-
Ryan, W.G., atic beta-cell adenoma.
Rubenstein, A.H., New Engl. J. Med. 283 (1970) 713-
Steiner, D.F. 719
39. Mirsky, J.A., : The inactivation of insulin by
Broh-Kahn, R.H. tissue extracts. I. The distribu-
tion and properties of insulin
inactivating extracts (insulinase).
Arch. Biochem. 20 (1949) 1-9

40. Morgan, C.R., : Immunoassay of insulin:two anti-
Lazarow, A. body systems:plasma insulin levels
of normal, subdiabetic and diabetic rats.
Diabetes 12 (1963) 115-126
41. Narahara, H.T., : Reduction of insulin by extracts
Williams, R.H. of rat liver.
J. Biol. Chem. 234 (1959) 71
42. Oyer, P.E., : Isolation and structure of human
Cho, S., proinsulin C-peptide.
Steiner, D.F. Fed. Proc. 29 (1970) 533
43. Rees, K.O., : The effect of proinsulin on hepatic
Madison, L.L. glucose output, arterial glucose and free fatty acid concentrations in dogs.
Diabetes 18 (1969) 341
44. Root, M.A., : Preparation and use of a purified
Ellis, R.M., porcine proinsulin antiserum.
Chance, R.E., Diabetes 29 (1970) 359
Galloway, J.A.
45. Roth, J., : "Big insulin": a component of
Gordon, P., plasma insulin detected by immuno-
Pastan, I. assay.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61 (1968)
138-148
46. Rubenstein, A.H., : Immunological properties of bovine
Cho, S., proinsulin and related fractions.
Lawrence, A.M., Diabetes 18 (1969) 598-695
Kirsteins, L.
47. Rubenstein, A.H., : Evidence for proinsulin in human
Cho, S., urine and serum.
Steiner, D.F. Lancet 6 (1968) 1353-1355

48. Rubenstein, A.H., : Secretion and circulation of the
Clark, J.L., proinsulin C-peptide.
Melani, F., Nature 224 (1969) 697-701
Steiner, D.F.
49. Rubenstein, A.H., : Proinsulin secretion, metabolism,
Melani, F., immunological and biological pro-
Pilkis, S., perties.
Steiner, D.F. Postgrad. Med. J. 45 (1969) Suppl.
476
50. Sherman, B.M., : Plasma proinsulin in 20 patients
Pek, S., with insulin secreting islet cell
Fagans, S., tumors.
Floyd, J., Diabetes 20 (1971) Suppl.1, 334
Conn, J.
51. Sönksen, P.H., : A comparative study of the meta-
Tompkins, Ch.V., bolism of human insulin and por-
Srivastava, M.C., cine proinsulin in man.
Nabarro, J.D.N. Clin. Scien. Molec. Med. 45 (1973)
633-654
52. Starr, J.T., : Metabolism of endogenous proinsu-
Katz, A.I., lin in man.
Steiner, D.F., Diabetes 21 (1972) Suppl.1, 347
Rubenstein, A.H.
53. Steiner, D.F., : Isolation and characterization of
Cho, S., proinsulin and C-peptide from bo-
Oyer, P.E., vine pancreas.
Terris, S., J. Biol. Chem. 246 (1972) 1365-
Peterson, J.D., 1374
Rubenstein, A.H.
54. Steiner, D.F., : Proinsulin and the biosynthesis
Clark, J.L., of insulin.
Nolan, C., Recant Progr. Horm. Res. 25 (1969)
Rubenstein, A.H., 207-272
Margoliash, E.,
Aten, B.,
Oyer, P.E.

55. Steiner, D.F., : Isolation and properties of pro-
Hallund, O., insulin, intermediate forms and
Rubenstein, A.H., other minor components.
Cho, S., Diabetes 17 (1968) 725-736
Bayliss, G.
56. Steiner, D.F., : The biosynthesis of insulin and a
Oyer, P.E. probable precursor of insulin by a
human islet cell adenoma.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57 (1967)
473-480
57. Stoll, R.W., : Clearance of porcine insulin, pro-
Touber, J.L., insulin and connecting peptide by
Manahan, L.A., the isolated rat liver.
Williams, R.H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133
(1970) 894-896
58. Stoll, R.W., : Hypoglycaemic activity and immuno-
Touber, J.L., logical half-life of porcine insu-
Winterscheid, L.C., lin and proinsulin in baboons and
Ensinck, J.W., swine.
Williams, R.H. Endocrin. 88 (1971) 714-717
59. Thomas, J.H. : The role of "insulinase" in the
degradation of insulin.
Postgrad. Med. J. 49 (1973) 940-
944
60. Tomizawa, H.H. : Mode of action of an insulin de-
grading enzyme from beef liver.
J. Biol. Chem. 237 (1962) 428-431
61. Tomizawa, H.H., : Isolation of an insulin degrading
Halsey, Y.D. enzyme from beef liver.
J. Biol. Chem. 234 (1959) 307-310
62. Tomizawa, H.H., : The mode of inactivation of insu-
Nutley, M.L., lin by rat liver.
Narahara, H.T., J. Biol. Chem. 214 (1955) 285-294
Williams, R.H.

63. Tomizawa, H.H., : Glutathion-insulin-transhydroge-
Varandi, P.T. nase of human liver.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 3191
64. Varandi, P.T. : Mode of action of glutathione-
-insulin-transhydrogenase. Studies
of the precipitate produced by its
action on insulin.
Biochem. Biophys. Acta 118 (1966)
198
65. Varandi, P.T. : Acceleration of regeneration of
insulin activity from its reduced
A- and B-chains by pancreatic GIT.
Biochem. Biophys. Acta 132 (1967)
10
66. Varandi, P.T., : Purification and properties of
Tomizawa, H.H. pancreatic glutathione-insulin-
hydrogenase.
Biochem. Biophys. Acta 113 (1966)
498-506
67. Wang, S.S., : A compositional assay for insulin
Carpenter, F.H. applied to a search for proinsulin.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 1619-
1625
68. Yalow, R.S., : Immunoassay of endogenous plasma
Berson, S.A. insulin in man.
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157-
1175
69. Yip, C.C. : A bovine pancreatic enzyme cata-
lysing the conversion of proinsu-
lin to insulin.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971)
1312-1315

70. Yu, S.S., : Biological activity of proinsulin
Kitabchi, A.E. and related polypeptides in the
fat tissue.
J. Biol. Chem. 218 No.11 (1973)
3753-3761

Lebenslauf

Am 26.11.1947 wurde ich, Joachim Klimek, als Sohn des Apothekers Franz Klimek und seiner Ehefrau Hildegard in Dortmund geboren.

Von 1954 - 1958 besuchte ich die Volksschule in Dortmund,

von 1958 - 1967 das Stadtgymnasium in Dortmund und legte dort am 5.Juli 1967 das Abitur ab. .

Von 1968 - 1973 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg Zahnmedizin.

Am 2.Juli 1973 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen und erhielt am 18.Juli 1973 die Bestallung als Zahnarzt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten :

Amon	Heuser	Petry
Aurich	Hort	Pfütz
Bernhardt	Janke	Riecken
Bock	Karlson	Rohen
Castenholz	Keil	Rosemann
Dehnicke	Koch	Rupc
Dimroth	Koecke	Schiff
Engelhardt	Korb	Schmidt
Goebell	Kühnel	Schmitz-Moormann
Haan	Mahr	Schnell
Hennis	Niemeyer	Seidel
Hering	Pantke	Walcher

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Hausmann für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Ahrens die Übernahme des Korreferats danken.

Außerdem möchte ich Herrn Doz. Koolmann, Dipl. Biochem., Inst. für Physiolog. Chemie der Universität Marburg, für die Hilfe bei der Präparation des Calcium - Phosphat -Gels danken.

